

SZAKMAI ZÁRÓJELENTÉS

A téma címe: Egy új citotoxinnak, a cytholethalis distending toxinnak (CDT) magyarországi előfordulása és molekuláris biológia jellemzése

A kutatás időtartama: 2002-2005

Bevezetés és célkitűzések

A cytolethalis duzzasztó (distending) toxin (CDT) egy új és nagy jelentőséggel rendelkező bakteriális citotoxin család. A CDT-t első sorban *Escherichia coli* termeli, de egyéb humán és állatorvosi jelentőséggel rendelkező baktérium fajokban is kimutatták. A CDT az első olyan bakteriális toxin, amely az arra érzékeny eukarióta sejtek mitózist megakadályozza azáltal, hogy a sejtciklust a G2/M fázis határán specifikusan leállítja. Az elsőként humán enteropathogén *E. coli*-ban (EPEC) kimutatott toxin mások és saját vizsgálataink szerint is egyéb pathogenetikai csoportokban is előfordul: így pl. kimutattuk a CDT-t a malacok választási hasmenésében és humán uropathogén törzsekben is.

Jelen pályázati munka célja volt

- A CDT-nek különböző haszonállatokból, emberből és élelmiszerből izolált *E. coli* és egyéb baktérium (*Salmonella*, *Enterobacter*, *Shigella*) törzsekben való elterjedtségének vizsgálata
- A CDT-termelő *E. coli* törzsek egyéb virulencia faktorainak és fenotípusos tulajdonságainak meghatározásával a jellegzetes Magyarországon elterjedt klónok molekulárbiológiai jellemzését kívántuk adni
- A diagnosztikai munka fejlesztésére a *cdt* kimutatására és tipizálására alkalmas különböző PCR módszereket kívántunk kialakítani. Ezen túl nemzetközi együttműködés keretében CDT specifikus monoklonális ellenanyagokat kívántunk előállítani
- Feltételezve egy új *cdt* variáns létezését, terveztük annak a genetikai jellemzését, a *cdt* operonnak a klónozását és nukleotid sorrendjének a meghatározását,
- Valamint az új toxint hordozó reprezentatív törzsszel állatkísérlet végzését.

Az elvégzett munka és eredmények

A CDT monitorozása és a CDT-termelő *E. coli* törzsek feno- és genotípusos jellemzése

Az eredeti célkitűzéseinknek megfelelően hazai haszonállatokból, emberből és élelmiszerekből izolált *E. coli* törzsekben monitoroztuk a CDT elterjedését. A vizsgálataink kiterjedtek sertésből, nyúlból, baromfiból, és főként húgyúti infekciók során emberből izolált *E. coli* törzsekre, de vizsgáltunk vérhast okozó enteroinvazív *E. coli* (EIEC) és *Shigella*

törzseket valamint a Nemzeti Orvosi Törzsgyűjtemény referencia törzsei közül *S. sonnei* (n=3), *S. flexneri* (n=2), *S. boydii* (n=3), *S. dysenteriae* (n=3) referencia törzseket, 1-1 *Enterobacter cloacae*, ill. *Enterobacter agglomerans* és két *Citrobacter freundii* referencia törzset, ill. 1-1 *Salmonella enteritidis*, *S. hadar* és *S. infantis* törzset. Nyolcvan vérhas-eredetű *E. coli* törzset, melyek 12 különböző szerocsoportba tartoztak és 43 *Shigella* – 23 *S. flexneri*, 13 *S. sonnei*, 2 *S. boydii* és 1 *S. dysenteriae*– törzset Pál Tibor (PTE, ÁOK) bocsátotta rendelkezésünkre.

Mivel a *cdtABC* operon génjei közül a *cdtB* gén a legkonzerváltabb, ezért egy olyan multiplex PCR rendszert terveztünk és alkalmaztunk, mely a *cdtB* génre 2-2 primert tartalmazott. Ezen rendszer alkalmasnak bizonyult minden eddig szekvenált *cdt* gén (*cdtI*, *cdtII* és *cdtIII*) kimutatására (Tóth I. és mtsai, 2003 a).

A korábbi ilyen irányú enterotoxikus *E. coli* (ETEC) vizsgálatokkal ellentétben sertések választási hasmenéséből izolált 82 enteropathogén *E. coli* (EPEC) egyike sem hordozta a *cdt* gént. Szintén nem fordult elő a *cdt* gén a nyulak hasmenéses megbetegedéseiből izolált 70 *E. coli* törzsben. Az extraintesztinális kórképekből származó baromfi eredetű *E. coli* (APEC) törzsek 10,1 %-ban (7/69) mutattuk ki a *cdt* gént, viszont nem jellemezte az intesztinális törzseket. Hús élelmiszer eredetű mintát vizsgálva egy baromfi eredetű törzsben mutattuk ki a *cdtB* gént. A vérhas eredetű törzsek közül egy O112 szerocsoportú EIEC és egy *S. sonnei* törzs hordozta a *cdt* gént. Sem a referencia törzsekben, sem a vizsgált *Salmonella* törzsekben nem fordult elő a *cdt* gén.

Líbiában gyermekekből izolált 50 *E. coli* törzset jellemeztünk, melyből 20 törzs származott hasmenéses gyermekek székletéből és 30 törzs származott egészséges gyermekek székletéből. A hasmenéses izolátumok között gyakran fordult elő EPEC és enteroaggregatív (EAEC) törzs. Egy O22 szerocsoportú nem-EPEC/nem-EAEC hasmenéses eredetű törzsben mutattuk ki a *cdtB* gént. A törzsben további virulencia faktor gént nem tudtunk azonosítani (Dow és mtsai, 2006, *in press*). Az egészségesekből származó törzsekben nem fordult elő a *cdt* gén, amely egy esetleges új pathotípust jelezhet. Közleményünkben a törzsek részletes geno- (virulencia gén, integron meghatározás és tipizálás) és fenotípusos jellemzését (szerotipizálás, *in vitro* adhéziós vizsgálatok és antibiotikum rezisztencia meghatározása) adtuk. Ezen munka részét képezi egy külföldi PhD ösztöndíjas (M. Dow) “Comparative analysis of enteric pathogenic *Escherichia coli* strains from young children and rabbits” c. PhD dolgozatának. A dolgozat beadásának várható időpontja 2006.

A *cdt*-pozitív *E. coli* törzsekben a *cdt* gén jelenlétét kolónia hibridizációs vizsgálatokkal megerősítettük és reprezentatív törzsek CDT termelését Hela szövettenyészetet alkalmazva bizonyítottuk. Southern hibridizációs vizsgálataink szerint a sertés, a baromfi és a humán eredetű törzsek teljes genomális DNS mintáit vizsgálva megállapítottuk, hogy a *cdt* gének a különböző fajok esetén eltérő méretű fragmenteken lokalizálódnak. Csupán a baromfi eredetű törzsekben kaptunk azonos hibridizációs mintázatot, több enzimmel (*HincII*, *BglI*) való hasítást követően is egyezést tapasztalva.

Egy új CDT típus (CDT-IV) első leírása

Nemzetközi együttműködésben részletesen jellemeztünk egy humán és állati eredetű *E. coli* törzsből álló reprezentatív CDT-termelő gyűjteményt. A kollekció humán,

szarvasmarha, sertés, bárány, baromfi, pinty és élelmiszer eredetű törzseket tartalmazott, összesen 9 különböző országból (8 európai ország és USA) származtak, s a törzsek igen változatos szerocsoportokba tartoztak. A *cdtB* univerzális primerek megerősítették a fenotípusos vizsgálatok eredményeit és az addig ismert *cdt* gén típusokra *cdtB* génekben lévő szekvencia különbségek alapján *cdt-I*, *cdt-II* és *cdt-III* típus specifikus primereket terveztünk és tipizáltuk a CDT-termelő törzsek *cdt* génjeit. Ezen PCR primerekkel a gének többségét eredménnyel tipizáltuk. Az ú.n. „nem-tipizálható” törzsekben viszont új *cdt* variánst, a CDT-IV toxint írtuk le: *cdtB-IV* szekvencia (GénBanki száma: AY162217). Az új toxinra tervezett specifikus primerekkel a *cdt-IV* gént kimutattuk intesztinális és extraintesztinális kórképekből származó humán, sertés és baromfi eredetű törzsekben. *In vitro* vizsgálataink szerint a CDT-IV toxin a megvizsgált törzs mindegyikében sejt-asszociált volt. A toxicitás mértéke megegyezett a CDT-III hatásával, ill. kevésbé toxikus, mint a szekretálódott CDT-I toxin (Tóth I. és mtsai, 2003 a.).

Az extraintesztinális kórképekből izolált baromfi eredetű *E. coli* izolátumokban kimutatott *cdtB* egységesen *cdt-IV* -nek bizonyult. A vizsgált 46 intesztinális eredetű baromfi törzsben a *cdt* nem fordult elő (Tóth I. és mtsai, 2003, MMT). A baromfi eredetű törzseket számos virulencia gén jellemezte, gyakran hordozták a „high pathogenicity island” (HPI) patogenitási szigetet (*fyuA*), *traT* (szérum rezisztenciát kódoló) gént, az *aerJ* aerobactin receptor gént, a hőérzékeny haemagglutint kódoló *tsh* gént, ill. kivétel nélkül rendelkeztek az I típusú fimbria *fimH* marker génjével, viszont P fimbriát kódoló gén szintén csak az extraintesztinális eredetű törzsekben fordult elő. A CDT-termelő baromfi eredetű törzsek eddig nem ismert (új) szerocsoportokba tartoztak (O115, O53) és a vizsgált tulajdonságok alapján két új klónt alkotnak. Egységesen (7/7) rendelkeztek a *fyuA*, *traT*, *aerJ*, *fimH* génekkel, viszont csak az O115 törzsek termeltek colicint (5/5) és csak az O53 (2/2) törzsek hordozták a *tsh* gént.

A molekuláris diagnosztikai fejlesztések

A *cdt*- diagnosztikus és tipizáló primerekkel vizsgáltunk további 353 Magyarországon izolált humán eredetű *E. coli* törzset, melyek közül 190 *E. coli* törzs húgyúti infekcióból (UPEC), 51 egyéb extraintesztinális fertőzésből, 112 törzs pedig egészséges egyedek székletéből származott. Az UPEC törzsek 7,9 % -a (15/190), az extraintesztinális nem-UPEC törzsek 5,9 % -a (3/51) tartalmazott *cdt* gént. A széklet eredetű törzsek közül csupán egy páciensből mutattuk a *cdtB* gént (0,9%). Ezen *cdt*⁺ törzsek közül 14 bizonyult *cdt-IV*-nek, és 5 törzsből a *cdt-I* volt kimutatható. A CDT-IV- termelő humán extraintesztinális törzsek az O2, O6, O75 és O170 szerocsoportúaknak bizonyultak (Tóth I. és mtsai, 2003 J Clin Microbiol).

A diagnosztikai munkákban együttműködő partnerünk (H. Ball, Belfast) az általunk azonosított (Tóth I. és mtsai., 2003a) *cdtB-IV* szekvencia ismeretében szintetizált rekombináns antigénnel BALB/c egeret immunizálva standard fúziós eljárással nagy számú CDT-specifikus monoklonális ellenanyagot állított elő. Az ELISA rendszerben pozitívnak bizonyult ellenanyag-termelő klónok (n=30) tisztítását elvégezve rendelkezünk három olyan klónnal, amely immuno blot analízisben is specifikusan kötődött a CDT-IV specifikus szintetikus antigénhez. A záró évben végzett kiterjedt ELISA vizsgálatok eredményei szerint azonban jelenleg nem tekinthetők ezen savók megfelelő diagnosztikus savóknak, mivel a tesztelt ellenanyagok egyenlőre *cdt*-negatív törzsszel is reagáltak.

A *cdt-IV* genetikai jellemzői

A szekvencia analízis eredményei szerint a *cdtB-IV* 84%-ban megegyezik a *cdtB-I* génnel. A *cdtB-IV* jelentősebben eltér mind a *cdtB-II*, mind a *cdtB-III* géntől, a homológia mértéke 55% ill. 54%.

Ez idáig egyetlen, sertés eredetű O75 törzsben (28c) szekvenáltak a teljes *cdtABC-IV* operont és annak környezetét (Oswald és mtsai, Gén banki szám: gi:50983070). A 28c prototípus törzsben a *cdt* operont fág eredetű gének veszik közre. Ezen génbanki adatok alapján tervezett PCR primerekkel E. Oswalddal (ENVT, Toulouse) együttműködve reprezentatív törzseket vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a *cdt-IV* operont gyakran határolják ugyanezek a fág eredetű gének, függetlenül a törzsek eredetétől. Azonban evolúciógenetikai szempontból fontosnak tartjuk megemlíteni, hogy a vizsgált két O115 baromfi törzs esetében a *cdtC* gént a fág eredetű proteáz gén határolja, viszont a *cdtA* környezete eltér a sertés eredetű O75 prototípus törzs környezetétől (*Oswald és Tóth nem publikált eredményei, kézirat közlésre előkészítve*). Az egyik saját O115 baromfi (E250) törzs - és a 28c jelzésű sertés törzs teljes genomjával végzett Southern hibridizációs vizsgálatok szerint, (négy enzimet is használva) megállapítottuk, hogy ezen törzsekben a *cdt* gének eltérő méretű fragmenteken foglalnak helyet, jelezvén, hogy a törzsek genomjai eltérő felépítésűek. Ezen hibridizációs eredmények alapján nem állapítható meg a *cdt-IV* operon integrációs helye sem.

Továbbá a munka folytatását illetően az is fontos lehet, hogy az összes baromfi eredetű CDT-IV termelő törzs lizogén. Spontán körülmények között és Mitomycin C indukciót követően is tudunk a törzsekből fágot kimutatni.

Hasonlóan fág eredetű gének határolják az időközben felfedezett EHEC O157 ill. egyéb szerocsoportú STEC törzseket alkalmanként jellemző *cdtV* operont is. Szintén jelen pályázat keretében a saját izolálású szarvasmarha eredetű *E. coli* O157:H7 és egyéb STEC törzsekben is kimutattuk a *cdtV* gén jelenlétét (*Tóth I, Lancz Zs, Nagy B., 2004*). Az általunk izolált *cdt*- pozitív szarvasmarha eredetű törzsekben a határoló régiót jelen pályázatban nem vizsgáltuk, viszont több ilyen törzsből szintén sikerült litikus fágot izolálni.

Baromfi eredetű *cdtIV* operon klónozása és inaktiválása

Az O115 szerocsoportú CDT-IV termelő E250 törzsből Nagy Gáborral (PTE, ÁOK) együttműködésben SuprCos klón- könyvtárát alakítottunk ki, azzal a céllal, hogy a *cdtABC-IV* operont azonosítsuk. A reprezentatív cosmid könyvtárból nagy számú (n=1920) klónt vizsgáltunk PCR-rel, és két *cdtB-IV* specifikus klónt azonosítottunk. Az *cdt* operonnak a szekvenálását nehezítette az a tény, hogy a rekombináns cosmidból nagy gyakorisággal integrálódott a *cdt* operon a gazdatörzs kromoszómájába. A pozitív klónok további tisztítását követően rendelkezünk egy olyan stabil klónnal, melyben a *cdtIV* operon szekvenálását megkezdjük.

További célunk annak tisztázása, hogy a CDT-IV - mint virulencia faktor szerepet játszik-e a patogenitásban. Ennek kiderítésére a *cdtB-IV* gén (génbanki szám: AY162217) inaktiválásával kívántunk választ kapni. A fentebb említett együttműködés keretében (Schneider György PTE, ÁOK és Nagy Gábor) több stratégiát is kipróbálva, suicide vektoros homológ rekombinációs eljárással deletálta a *cdtB* gént az E250 jelzésű O115 baromfi törzsből. Az általunk használt suicide plazmid a pSG704 (*oriR6K*, *mobRP4*, M13 tg131,

Cm^R, Schneider Gy., PhD tézis, 2005), amely Miller és Mekalanos által használt pGP704 (*oriR6K*, *mobRP4*, M13 *tg131*, Ap^R) származéka. A klóramfenikol rezisztenciát (Cm^R) hordozó pSG704 használatára az E250 ampicillin rezisztenciája miatt volt szükség. A *cdtB* gén delécióját PCR-rel igazoltuk. A CDT mutáció fenotípusos megnyilvánulását HeLa sejttenyészetben is ellenőriztük.

Állatkísérletek

A korábbi OTKA pályázatunk során részletesen jellemzett *E. coli* O157H7 és antibiotikum-rezisztens O157:NM ill. hipermotilis törzsek *in vivo* összehasonlító virulencia vizsgálataiban sikerrel alkalmaztunk egy iv. egér modellt (Tóth I, Csík M. Emődy L., 2003, *Acta Vet*). Ezen eredményeink alapján logikusnak éreztük, hogy jelen pályázatunkban a tervezett költséges sertés fertőzési kísérletek helyett szintén a jóval kisebb anyagi ráfordítást jelentő egér modellt alkalmazzuk a virulencia vizsgálatokban. Választásunk helyesnek bizonyult, hiszen a CDT-IV termelő E250 jelzésű O115 szerocsoportú baromfi eredetű törzs hatására az egerek dózis-függő elhullását tapasztaltuk, míg a kontrollként használt *E. coli* K-12 (C600) törzs esetében egyetlen állat sem pusztult el.

Az E250 szülői és E250(Δ *cdtB*) izogén mutáns törzssel végzett egér fertőzési kísérletekben szignifikáns eltérést nem tapasztaltunk az E250 szülői ill. *cdt*-mutáns törzs okozta elhullások között. A mutáns ill. a szülői törzs közel azonos elhullási kinetika szerint és azonos hatékonysággal pusztították az egereket.

Ezen eredményeink alapján úgy tűnhet, hogy a CDT-IV nem feltétlenül tekinthető olyan elsődleges virulencia faktornak, amelynek hiányában elmaradna a megbetegedés, azonban ezen kérdésnek a megnyugtató megválaszolása további vizsgálatokat igényel. Hiszen, az E250 további virulencia faktorokkal rendelkezik, így hordozza a teljes HPI patogenitási szigetet, ami vasértékesítést határozza meg, az aerobactin receptor gént, a colicintermelést kódoló virulencia plazmidot és szérum rezisztenciát kódoló *traT* gént is. Továbbá, az egérmodell mellett fontosnak tartjuk izogén törzspárral végzett virulencia vizsgálatokat napos csibében is elvégezni, amely rendszer talán még érzékenyebb detektálást tesz lehetővé.

Megbeszélés

Célkitűzéseinknek megfelelően Magyarországon még szisztematikusan nem vizsgált citotoxinnak (CDT) az elterjedését vizsgáltuk és jellemeztük a citotoxikus törzseket azzal a céllal, hogy a jellemző virulens klónokat azonosítsunk. A CDT kimutatására és tipizálására alkalmas diagnosztikai PCR eljárást dolgoztunk ki, s a pályázat keretében a CDT-nek egy új típusát, a CDT-IV toxint fedeztük fel. A CDT-IV igen elterjedt, hiszen jellemezte a humán húgyúti fertőzéseket okozó (UPEC) törzseket, egyéb extraintesztinális infekciókból származó törzseket, ill. a sertések választási hasmenésének és baromfi szepszisének eseteiből izolált *E. coli* törzsek esetében csak a CDT-IV volt kimutatható.

Összefoglalva, CDT kimutatására és tipizálására alkalmas új PCR rendszert fejlesztettünk ki, melynek segítségével egy a humán és állati eredetű izolátumok széles körben elterjedt új toxint (CDT-IV) fedeztünk fel, ami valószínűleg új extraintesztinális virulencia faktor.

A virulencia faktorokat kódoló gének az esetek zömében mobilis genetikai elemeken (fágon, plazmidon, patogenitási szigeten vagy transzpozonon) lokalizálódnak és ennek következtében a virulencia gének horizontális terjedésében játszanak szerepet. Jelen pályázat eredményei szerint a *cdt-IV* operon is fág eredetű génekkel határos. Mindezek alapján fontosnak tartjuk a *cdtIV* pontos lokalizációjának a meghatározást, tisztázni, hogy az új toxint kódoló gének részét képezik-e egy profágnak, esetleg konvertáló fág genomjában foglalnak helyet, s így a fág további törzseket is képes lizogenizálni és toxikussá alakítani. A kérdés tanulmányozásának a feltételei adottak, hiszen rendelkezünk a pályázat keretében előállított antibiotikum rezisztencia kazettával hatástalanított CDT-IV toxint hordozó törzsszel és egy alkalmas transzdukciós modellel is, melyet alkalmazva *in vivo* körülmények között, lekötött sertés bélkacsban, egy sertés eredetű O45 EPEC törzset sikerrel lizogenizáltunk *stx2* fággal (Tóth I. és mtsai, 2003, *Appl. Environ. Microbiol.*), jelezvén, hogy *in vivo* körülmények között is kialakulhat EPEC törzsből EHEC. Tudomásunk szerint ilyen transzdukciós eredményekről még nem számoltak be sem *cdt-IV*, sem a legújabban felfedezett *cdt-V* vonatkozásában.

